

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 15, 1977, pp. 481–484

## Einfluß von Testosteron auf die $^{65}\text{Zn}$ -bindenden Proteine in Prostata und Samenblasen von Ratten

Von R. Arlt, R. Förster, F. Scherr und T. Günther

*Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Freie Universität Berlin*

(Eingegangen am 25. Januar/24. März 1977)

**Zusammenfassung:** Im 100 000 g-Überstand aus Prostata und Samenblasen von normalen, kastrierten und kastrierten, Testosteron-substituierten Ratten wurde 1, 24 und 48 Stunden nach i. v. Injektion von 7,4 MBq (200  $\mu\text{Ci}$ )  $^{65}\text{Zn}$  das Verteilungsmuster der  $^{65}\text{Zn}$ -bindenden Proteine nach Trennung mit Sephadex G 100 ermittelt.

Das Verteilungsmuster der  $^{65}\text{Zn}$ -Proteine in Prostata und Samenblasen von normalen, kastrierten und kastrierten, Testosteron-substituierten Tieren war gleich. Bei den kastrierten Ratten war der Einbau von  $^{65}\text{Zn}$  jedoch 5–6 mal niedriger als bei den normalen oder kastrierten, Testosteron-substituierten Ratten.

Eine Stunde nach Injektion von  $^{65}\text{Zn}$  befand sich die höchste  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität in den Proteinen mit hohem Molekulargewicht ( $> 100\,000$ ), während 48 Stunden p. i. der größte Teil der  $^{65}\text{Zn}$  Aktivität im Protein-Peak mit 28 000 Daltons vorlag.

### *Influence of testosterone on the distribution of $^{65}\text{Zn}$ -binding proteins in the prostate and seminal vesicles of rats*

**Summary:**  $^{65}\text{Zn}$  (7.4 MBq; 200  $\mu\text{Ci}$ ) was injected intravenously into normal, castrated and castrated, testosterone-substituted rats. After 1, 24 and 48 hours, the distribution of  $^{65}\text{Zn}$ -binding proteins in the 100,000 g supernatant of the prostate and seminal vesicles was investigated by separation on Sephadex G 100.

The prostate and seminal vesicles from any one rat showed the same distribution pattern of  $^{65}\text{Zn}$ -proteins. In castrated rats, the incorporation of  $^{65}\text{Zn}$  was, however, 5–6 times lower than in the normal or castrated, testosterone-substituted rats.

One hour after the injection, the highest activity of  $^{65}\text{Zn}$  was found in proteins in the molecular weight range above 100,000. After 48 hours the greatest proportion of  $^{65}\text{Zn}$  was present in the protein peak corresponding to 28,000 Daltons.

### Einleitung

Im Organismus kommt Zink praktisch nur in gebundener Form vor. Es ist dabei an bestimmte Metalloproteine gebunden. Mit  $^{65}\text{Zn}$  läßt sich zeigen, daß  $^{65}\text{Zn}$  im Lebercytoplasma zuerst an höhermolekulare Proteine und von diesen später in Proteine mit mittlerem Molekulargewicht gelangt (1).

Prostata und Samenblasen gehören wie die Leber zu den Organen mit dem höchsten Zn-Gehalt (2, 3). Der Zn-Gehalt in diesen Organen unterliegt im Gegensatz zur Leber (4) der Kontrolle durch Testosteron, wenn auch die spezifische physiologische Rolle des Zn in diesen Organen ungeklärt ist (3). Die Drüsenzellen von Samenblasen und Prostata – besonders ihr dorso-lateraler Teil – (2, 3) haben bei normalen Tieren einen hohen Zn-Gehalt.

Nach Kastration sinkt er z. B. bei der Prostata auf 10%. Substitution mit Testosteron verhindert das Absinken (5). Das Gewicht dieser Organe und besonders ihr Gehalt an alkalischer und saurer Phosphatase, welche selbst Zn enthält, reagieren gleichartig (6). Wir haben deshalb an diesen Organen die Induktion bzw. Regulation der Zn-bindenden Proteine untersucht.

### Methodik

Wir verwendeten männliche Albinoratten (Sprague-Dawley, Institut für Versuchstierkunde, FU Berlin). Die Tiere erhielten Altromin und Leitungswasser ad libitum. Ein Teil der Ratten wurde bei einem Gewicht von durchschnittlich 170 g in Äthernarkose kastriert. 5 Wochen später – bei einem Gewicht von 220 g – erhielt die Hälfte der kastrierten Tiere täglich 1 mg

Testosteronpropionat (Testoviron, Firma Schering, Berlin) s. c. injiziert. 48 Stunden nach Beginn der Substitution mit Testosteron wurde jeder Ratte 7,4 MBq (200  $\mu$ Ci)  $^{65}\text{ZnCl}_2$  (spezif. Aktivität etwa 7,4 MBq (200  $\mu$ Ci)/ $\mu\text{g Zn}$ , Radiochemical Centre, Amersham) i. v. injiziert. Nach 1, 24 und 48 Stunden wurden je 3 Ratten getötet, ihre Prostata und Samenblasen entnommen und gewogen. Die Prostata bzw. beide Samenblasen wurden mit 2 ml gekühlter 0,25 mol/l Rohrzuckerlösung im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert und 1 Stunde bei 100 000 g und 0 °C zentrifugiert.

Gleichschwere, normale und kastrierte-nichtsubstituierte Ratten erhielten ebenfalls 7,4 MBq (200  $\mu$ Ci)  $^{65}\text{ZnCl}_2$  i. v. und wurden 1, 24 bzw. 48 Stunden später in gleicher Weise aufgearbeitet.

Vom 100 000 g-Überstand wurde jeweils 1 ml auf einer Säule (Pharmacia K 15/90, 90 cm  $\times$  1,5 cm), die mit Sephadex G 100 gefüllt war, mit 0,05 mol/l Tris Cl, pH 7,5, in 0,1 mol/l NaCl bei Raumtemperatur (22 °C) getrennt. Die Durchflusgeschwindigkeit betrug 0,25 ml/min. Fraktionen zu je 2 ml wurden aufgefangen.

In diesen Fraktionen wurde die Radioaktivität im NaJ-Bohrloch-Kristall (Firma Frieseke-Berthold) und der Proteingehalt photometrisch bei 280/260 nm gemessen. Die Verteilung der  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität in den Elutionsdiagrammen auf die einzelnen Aktivitäts-Peaks wurde planimetrisch bestimmt.

In den 100 000 g-Überständen wurde außerdem die  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität im NaJ-Bohrloch-Kristall, der Proteingehalt nach Lowry et al. (7) und die Aktivität der Phosphatasen gemäß Boehringer-Vorschrift (Biochemica-Test Combination Nr. 15 987 bzw. 15 988) ermittelt.

## Ergebnisse

Das Gewicht und die Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase von Samenblasen und Prostata verhielten sich nach Kastration und nach Substitution mit 1 mg Testosteronpropionat/Tag in gleicher Weise wie bereits beschrieben (5).

Nach Gelchromatographie des 100 000 g Überstandes an Sephadex G 100 erhält man von Samenblasen und Prostata das gleiche Muster von  $^{65}\text{Zn}$ -bindenden Proteinen (Abb. 1 a, b). Neben Protein-gebundenem  $^{65}\text{Zn}$  ist ein Teil der  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität an niedermolekulare Substanzen gebunden. Ein flacher Aktivitätspeak lag zwischen 120 und 150 ml (Molekulargewicht  $< 1000$ ), ein zweiter zwischen 150 und 180 ml. In beiden Organen lassen sich etwa 95% der an Protein gebundenen  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität 4 Peaks vom Molekulargewicht  $> 100 000$ , 80 000, 50 000 und 28 000 Daltons zuordnen.

Die prozentuale Verteilung der  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität auf diese 4 Peaks ist in Tabelle 1 enthalten. Zwischen normalen, kastrierten und kastrierten, Testosteron-substituierten Ratten besteht kein signifikanter Unterschied in der relativen Verteilung der  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität auf die einzelnen Zn-Protein-Fraktionen. Die absolute Rate des  $^{65}\text{Zn}$ -Einbaues in die Zn-Proteine des 100 000 g-Überstandes ist bei den Testosteron-substituierten Ratten 1, 24 und 48 Stunden nach Injektion von  $^{65}\text{Zn}$  jedoch jeweils 5–6 mal so groß wie bei den nichtsubstituierten, kastrierten Tieren (nicht dargestellt). Hiermit übereinstimmend wurde schon früher eine reduzierte  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme in die Prostata, besonders in den androgen-

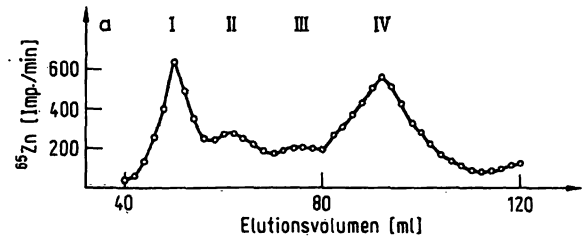


Abb. 1 a. Elutionsdiagramm (Sephadex G-100) von 1 ml des 100 000 g-Überstandes der Samenblasen von kastrierten, Testosteron-substituierten Ratten 24 Stunden nach i. v.-Injektion von 7,4 MBq (200  $\mu$ Ci)  $^{65}\text{ZnCl}_2$ . Mittelwerte von 2 Tieren. Gewicht der Samenblasen 340 mg und 290 mg. Die Radioaktivität in den 2-ml-Fraktionen wurde im NaJ-Bohrloch-Kristall gemessen. Impulsvorwahl: 2000.

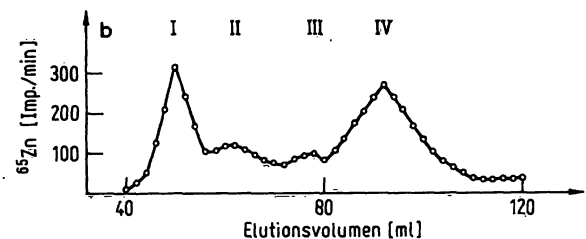


Abb. 1 b. Elutionsdiagramm der 100 000 g-Überstände der Prostata derselben Tiere wie in Abb. 1 a. Prostatagewicht 170 mg und 140 mg.

Tab. 1. Verteilung der proteingebundenen  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität im 100 000 g-Überstand von Samenblasen normaler, kastrierter und Testosteron-substituierter, kastrierter Ratten 1, 24 und 48 Stunden nach i. v.-Injektion von 7,4 MBq (200  $\mu$ Ci)  $^{65}\text{ZnCl}_2$  pro Ratte. Jeweils 1 ml des 100 000 g-Überstandes wurde auf einer Sephadex G 100-Säule getrennt. Die gesamte proteingebundene  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität jedes Tieres wurde gleich 100% gesetzt. Angaben in % der gesamten proteingebundenen  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität pro peak. Mittelwert aus je 3 Tieren.

Stunden nach Injektion von $^{65}\text{ZnCl}_2$	Tiergruppe	peak (%)			
		I	II	III	IV
1	normal	30,0	18,8	15,4	27,1
	kastr. + Testosteron	32,3	13,4	15,0	26,2
	kastriert	31,7	12,6	15,4	22,5
24	normal	24,6	18,0	13,5	43,0
	kastr. + Testosteron	26,6	16,3	12,0	42,8
	kastriert	24,3	16,0	13,1	40,0
48	normal	23,0	19,2	14,9	40,0
	kastr. + Testosteron	22,4	16,4	14,7	43,1
	kastriert	23,1	16,9	12,3	44,1

abhängigen dorsolateralen Teil von kastrierten Ratten und ihre Normalisierung durch Testosteron gefunden (8, 9).

Tabelle 1 zeigt weiterhin das zeitliche Verhalten der  $^{65}\text{Zn}$ -bindenden Proteine. 1 h nach der Injektion von

$^{65}\text{Zn}$  ist die  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität im peak I mit etwa 32% am höchsten und sinkt innerhalb von 48 Stunden auf etwa 23% ab. Während der gleichen Zeit steigt die  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität in peak IV von etwa 25% auf etwa 42% an. In peak II und III bleibt der relative Gehalt an  $^{65}\text{Zn}$  etwa gleich. Dieses Verhalten entspricht dem  $^{65}\text{Zn}$ -turnover in der Leber, wo  $^{65}\text{Zn}$  ebenfalls aus einer hochmolekularen Proteinfraction, die  $^{65}\text{Zn}$  schnell aufnimmt, in eine Proteinfraction mit einem Molekulargewicht von etwa 20 000 eingebaut wird (1).

## Diskussion

Der Zn-Stoffwechsel in den Drüsenzellen der Samenblasen und im dorsolateralen Teil der Prostata wird spezifisch durch Testosteron reguliert. Dies ergibt sich aus dem Verhalten des Zn-Gehaltes und der Einbauraten von  $^{65}\text{Zn}$  bei kastrierten und kastrierten, Testosteron-substituierten Tieren. Der Zn-Stoffwechsel in Prostata und Samenblasen unterscheidet sich somit vom Zn-Stoffwechsel in Leber und Skelettmuskel, wo der Zn-Gehalt unabhängig vom männlichen Sexualhormon ist (4).

In Samenblasen und Prostata liegt das Zn ebenfalls an Proteine gebunden vor. Das Verteilungsmuster der  $^{65}\text{Zn}$ -Proteine in diesen Organen unterscheidet sich aber von dem in der Leber, deren Molekulargewichte bei > 100 000, 77 000, 36 000 und 16 000 Daltons liegen (1). Außer an Proteine ist  $^{65}\text{Zn}$  im 100 000 g-Überstand von Prostata und Samenblasen noch an niedermolekulare Substanzen gebunden. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Polyamine, die Zn komplex binden können und die in diesen Organen in großer Menge vorkommen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß in der 100 000 g-Überstandsfraktion  $^{65}\text{Zn}$ -bindende Substanzen aus dem Zell-Cytoplasma und aus dem Drüsensekret dieser Organe enthalten sind. Der jeweilige Anteil an Drüsensekret im 100 000 g-Überstand des Organhomogenats ist unbekannt.

Eine Bindung von  $^{65}\text{Zn}$  an verschiedene Proteine des Prostatasekrets wurde elektrophoretisch nachgewiesen ((10), Literatur s. (11)). Daneben wird  $^{65}\text{Zn}$  im Prostatasekret auch an andere Substanzen gebunden (10). Im Gegensatz hierzu fanden Johnson et al. (11), daß  $^{65}\text{Zn}$  im Prostatasekret fast nur an niedermolekulare Peptide gebunden wird. Es ist jedoch zu bedenken, daß in diesen Versuchen die Proteine mit Trichloressigsäure

ausgefällt wurden, wobei  $^{65}\text{Zn}$ , wie wir fanden, aus seiner ursprünglichen Bindung in Metalloproteinen entfernt wird. Im Prostatagewebe selbst soll  $^{65}\text{Zn}$  auch an saure Polysaccharide gebunden werden (12, 13).

Die Charakterisierung und Identifizierung der  $^{65}\text{Zn}$ -bindenden Proteine in Prostata und Samenblasen wird dadurch erschwert, daß nur ein verschwindend geringer Teil der injizierten  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität in diesen Organen erscheint, im dorsolateralen Teil der Prostata z. B. nur 1% (3).

Das bedeutendste Ergebnis ist, daß das  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilungsmuster bei normalen, kastrierten und kastrierten, Testosteron-substituierten Ratten gleich ist. Es kann sich bei diesem Ergebnis nicht um Artefakte bei der Aufarbeitung und Trennung handeln. In diesem Fall hätte auch in den Organen, die zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion von  $^{65}\text{Zn}$  aufgearbeitet wurden, prozentual die gleiche  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilung auftreten müssen. In früheren Versuchen (1) fanden wir nach Zugabe von  $^{65}\text{Zn}$  zu Lebercytoplasma in vitro ein  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilungsmuster wie 30 Minuten nach i. v.-Injektion von  $^{65}\text{Zn}$ . Dieses  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilungsmuster unterschied sich erheblich von dem, das zu späteren Zeiten p. i. gewonnen wurde. Die Verdünnung des Cytoplasmas bei der Aufarbeitung hat offenbar wegen der hohen Stabilitätskonstanten der Zn-bindenden Proteine keinen wesentlichen Einfluß.

Aus dem Ergebnis, daß sich die  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität in den Zn-bindenden Proteinen bei den kastrierten und substituierten Tieren bei gleichem  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilungsmuster um den Faktor 5–6 unterscheidet, kann man den Schluß ziehen, daß alle  $^{65}\text{Zn}$ -bindenden Proteine im gleichen Maße durch Testosteron induziert werden. Ein verlangsamter  $^{65}\text{Zn}$ -Einbau in alle Zn-bindenden Proteine der kastrierten Ratten ist auszuschließen, da das zeitliche Verhalten der  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilungsmuster bei den 3 Tiergruppen gleich war. Der  $^{65}\text{Zn}$ -turnover läuft also bei allen Tiergruppen gleich schnell ab, unter Testosteron jedoch bei höheren  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivitäten.

Testosteron induziert demnach in den androgen-abhängigen Zellen von Prostata und Samenblasen die Biosynthese (14) von Zn-bindenden Proteinen, alkalischer und saurer Phosphatase (6), ATPase (15), Polyamin-synthetisierenden Enzymen (16) und, wie die Gewichte dieser Organe und deren Morphologie (17) zeigen, noch die Synthese weiterer Zellproteine.

## Literatur

- Günther, T., Ruhe, B., Schmalbeck, J. & Tehrani, N. (1974), diese Z. 12, 327–335.
- Vallee, B. L. (1959), *Physiol. Rev.* 39, 443–490.
- Byar, D. P. (1974), in Brandes, D. (ed.) *Male Accessory Sex Organs*, p. 161–171 Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Dorn, F. & Günther, T. (1970), diese Z. 8, 618–620.
- Mackenzie, A. R., Hall, T., Lo, M.-C. & Whitmore, Jr., W. F. (1963), *J. Urol.* 89, 864–874.
- Porter, I. C. & Melampy, R. M. (1952), *Endocrinology* 51, 412–420.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Gunn, S. A. & Gould, T. C. (1956), *Endocrinology* 58, 443–452.

9. Millar, J. J., Elcoate, P. V. & Mawson, C. A. (1957), *Canad. J. Biochem.* **35**, 865–868.
10. Gunn, S. A., Gould, T. C. & Anderson, W. A. D. (1962), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 32–36.
11. Johnson, L., Wikstrom, S. & Nylander, G. (1969), *Scand. J. Urol. Nephrol.* **3**, 9–11.
12. Gyorkey, F. & Sato, C. S. (1968), *Exp. Mol. Pathol.* **8**, 216–224.
13. Sato, C. S. & Gyorkey, F. (1969), *Cancer Res.* **29**, 399–402.
14. Williams-Ashman, H. G., Shutsung, L., Hancock, R. L., Jurkovitz, L. & Silverman, D. A. (1964), *Rec. Prog. Hormone Res.* **20**, 247–301.
15. Ahmed, K. & Williams-Ashman, H. G. (1969), *Biochem. J.* **113**, 829–836.
16. Williams-Ashman, H. G., Jänne, J., Coppoc, G. L., Gerock, M. E. & Schenone, A. (1972), *Adv. Enzyme Regul.* **10**, 225–245.
17. Brandes, D. P. (ed.) (1974), *Male Accessory Sex Organs*, p. 183–222 Acad. Press, New York, San Francisco, London.

Prof. Dr. T. Günther  
Arnimallee 22  
D-1000 Berlin 33